

特公平6-75500

(24) (44)公告日 平成6年(1994)9月28日

(51)Int.Cl. C 12N C 12G f (C 12N C 12R	類別記号 I/16 3/02 1/16 I: 865)	案内登録番号 G 7236-4B 119 G	F I	技術表示旨所
----------------------------------------------------	-----------------------------------------	------------------------------	-----	--------

請求項の数 2(全 8 頁)

(21)出願番号 特願平2-60578	(71)出願人 99999999 大蔵株式会社 兵庫県西宮市今津出在塩町4番3号
(22)出願日 平成2年(1990)3月12日	(71)出願人 99999999 國税厅長官 京都府千代田区北河内3丁目1番1号
(65)公開番号 特開平3-262473	(72)発明者 鶴野 栗治 兵庫県西宮市今津社前町4番27-104号
(42)公開日 平成3年(1991)11月22日	(72)発明者 北本 研二 東京都新宿区百人町3丁目19番1-810号
微生物の受託番号 FERM P-11269	(72)発明者 大島 良美 東京都調布市柴崎1丁目63番3号
	(72)発明者 庭井 史子 大阪府茨木市若田6丁目1番3号
	(74)代理人 弁理士 吉山 森 (外1名)
	審査官 因守 久喜

最終頁に跨る

## (54)【発明の名称】 生理活性成分を漏出する酵母および該酵母を用いる酒類の製法

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 濃缩形栽培を欠損し、物質輸送装置または逆伝導感受性を有し、かつ醸造適性を備えた酵母。

【請求項2】 請求項第(1)項記載の酵母を用いてアルコール発酵を行い、生理活性成分を含めた酒類を得ることを特徴とする酒類の製法。

## 【発明の詳細な説明】

## 産業上の利用分野

本発明は生理活性成分、ことにグルタチオンを菌体外に漏出する新規な酵母および該酵母を用いる新規な酒類の製法に関する。さらに詳しくは、酵母菌体内で生産され、通常は菌体内で貯藏、消費されるグルタチオン等の生理活性成分を菌体外に漏出し、かつ醸造適性を有する酵母、ならびに該酵母を用いてアルコール発酵を行い、グルタチオン等の生理活性成分の含有の高い酒類を製造

2

する方法に関する。

## 従来の技術

グルタチオンは3種のアミノ酸、グルタミン酸、システインおよびグリシンが結合した生理活性ペプチドであって、動植物の細胞に広く分布し、生体内で解毒作用および酸化還元平衡作用に関与している。この生理性作用に着目してグルタチオンはアルコール性脂肪肝の治療剤など肝臓疾患治療剤として広く用いられてきた。

一方、近年、健食志向の進展により機能性食品が脚光を浴びるに至り、食品の分野においてもグルタチオンの生理活性作用に基づき、グルタチオン含有食品が注目され始めている。しかしながら、酒類においてはグルタチオンを含有するものは現在ほとんどなく、たとえ、グルタチオンを含有していても通常その量は1ppm以下と少ない。これは、以下のようなる事情による。

10

すなわち、第1に、酵母自体はグルタチオン生産能力を有するが、梢円型、卵型のいわゆる酵母型の形態を保つ酵母細胞の外側は強固な細胞壁と細胞膜で覆われており、生産されたグルタチオンは菌体外への漏出が制限されている。第2に、グルタチオンを細胞内で発酵生産させ、追従的に細胞外へ漏出させる方法としては、サッカロマイセス・グリオキサールフィラス (*Saccharomyces diyoxyalophilus*) (特開昭53-94088号)、カンディダ・トロビカリス (*Candida tropicalis*) PK233 (特開昭53-1452974号) を用いる方法などが提案されているが、これらの方法はいずれもグルタチオンの製造自体に重点が置かれたものであり、用いられる酵母類は醸造のための差切な発酵能を有するものではない。さらに、酵母においては酵母の規制により製造方法および添加物が制約されている関係上、これらの方法などを応用することはできない。この間の事情は他の生産活性成分についても同様である。

従って、グルタチオン等の生理活性成分を含む酒類を敢えて製造しようとするれば、別途に製造した生理活性成分を酒類に添加するか、またはアルコールによる自己消化などにより、醸造工程で醪中の酵母を人为的に自己消化させ、グルタチオンを菌体外に漏出させるしかなかつた。しかしながら、前者の方法は酒税法による罰則のため適切でなく、また、後者の方法では自己消化臭などにより酒類の品質を著しく低下させてしまう。

#### 発明が解決しようとする課題

かかる事情により、従来、グルタチオン等の有用な生理活性成分を多く含有する酒類の醸造は実現できなかつた。

そこで、酒税法上の問題なく、通常の酒類の仕込み方法が適用でき、かつグルタチオン等の生理活性成分を多く含み、品質においても通常品と比べて遜色の無い酒類が得られる新しい製法の出現が望まれてきた。

本発明者らは、このような要望に答えるべく、生理活性成分含有酒類の製法を試行研究した。

#### 課題を解決するための手段

従来の酵母では、菌体内で生産された成分は通常の発酵では菌体外に放出され難い。また、グルタチオンなどの特定の成分は、菌体内で生産、貯蔵され、必要に応じて菌体内で分解、利用される。従って、第1に、目的成分を菌体外に十分放出させるためには、菌体内における該成分の分解を抑制する必要がある。第2に、目的の成分を菌体外に放出し、かつ、アルコール発酵性も同時に有するような酒類醸造適性を兼ね備えた酵母を開発する必要があり、しかも該放出は自然に行われ、通常の酒類醸造工程が適用できる酵母が望ましい。

そこで、本発明者らは、まず、酵母菌体内の生理活性成分の1つであるグルタチオンに着目し、グルタチオン分解酵素であるアーグルタミルトランスペプチダーゼが存在し、グルタチオンの貯蔵および分解が行われる器官の

1つである液胞を形成しない菌株の育種を試みた。液胞形成能欠損株を選択したのは、液胞欠損により菌体内での物質の輸送系を裏面をきたしグルタチオンを菌体外に漏出することが予想され、さらに、液胞が形成されないことにより菌体内外の競争圧に対して感受性となり、生育過程で菌体が崩壊して他の有用生理活性成分が漏出することも考えられたからである。

液胞形成能欠損株としては、本発明者らの1人である北原の方針 [ジャーナル・オブ・バクテリオロジー (J. Bacteriol.), 170, 2687 (1988)] により得られるサッカロマイセス・セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*) KL-197-128を出发株とした。このKL-197-128より、調べてみると、後記参考例1に示したごとく従来の醸造用酵母に比べて増殖速度および発酵力が極めて低く、酒類の醸造適性を有しないことが判明した。そこで、醸造用酵母 (錦会酵母7号、以下K-7という) を反復漬として用い、長い交配を行って醸造適性を高めることを試みた。

かかる長い交配の結果、増殖能力、発酵能力、さらには、グルタチオン等の菌体内生理活性成分の漏出性および醸造酒の品質の面においても満足できる酵母が得られることを見い出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、液胞形成能を欠損し、物質輸送装置または競争圧感受性を有し、かつ発酵能および生育能などの醸造適性を備えた新規な酵母を提供するものである。また、かかる酵母を用いてアルコール発酵を行い、生理活性成分含量を高めた酒類を得ることを特徴とする酒類の製法も提供する。

かくして、本発明の酵母はサッカロマイセス・セレビシエの液胞形成能欠損株と醸造用酵母を公知の方針に従って重複交配し、得られた菌株を、発酵能、増殖能およびグルタチオン漏出能についてスクリーニングし、優良株を選抜することによって得られる。

用いる液胞形成能欠損株としては、前期のKL-197-128が挙げられるが、これに限定するものではなく、例えば、前記北原の方針に従って公知のサッカロマイセス・セレビシエ株の液胞形成能欠損株としたものでもよい。

また、醸造用酵母株も、K-7に限定するものではなく、他の清酒酵母およびワイン酵母、ビール酵母など、公知の醸造用酵母株が使用できる。

得られた酵母は世代により、その特性を安定に保持することができ、これを用いて、通常の醸造工程により、酒類を得ることができる。例えば、米または穀類を麹または酵素と共にアルコール発酵させるのに該酵母を用いることができ、例えば、グルタチオンを15~20ppm程度と、従来の酒類よりも著しく多量に含有する酒類が得られる。

実施例  
以下に参考例および実施例を上げて本発明をさらに詳し

く説明する。

#### 参考例1 グルタチオンを菌体外に漏出する

##### KL-197-12Bの性質

実地醸造の米麹に吸水率合25%の水を加え、55°Cで16時間発酵し、次いで速心分離することによって得た上澄み液を酵汁培地 (B25.5) として用い、この培地100mlにサッカロマイセス・セレビシエKL-197-12Bおよびサッカロマイセス・セレビシエK-7を各々 $2 \times 10^8$ 個植菌し、15°Cで静置培養し、グルタチオン漏出量の経時変化を測定した。

なお、グルタチオン量の測定はチュッヅェ (Tzetzel) 法 (以下、グルタチオン量の測定はこの方法による) により、他の成分量の測定は国税庁所定分析法により行った。また、死滅率は顕微鏡下メチレンブルー紫色法により求めた。

第 1 表

菌株	測定区分	0 時間	22 時間	48 時間	70 時間
KL-197-12B	グルタチオン (%)	1.51	5.68	8.26	10.61
	アミノ酸度 (%)	1.77	1.50	1.28	1.10
	アルコール (%)	0.18	0.98	2.45	3.43
	死滅率 (%)	0	1	2	3
K-7	グルタチオン (%)	0.41	0.32	0.61	1.56
	アミノ酸度 (%)	1.78	1.15	0.82	0.57
	アルコール (%)	0.12	1.87	2.58	4.19
	死滅率 (%)	6	6	2	2

第1表に示すごとく、KL-197-12BではK-7とは異なり、培養の時間経過と共にグルタチオンの菌体外漏出量が増加した。また、同菌の死滅率は高くなく、培養初期からグルタチオンを漏出していることより、グルタチオンの漏出は菌体の自己消化によるものではなく、菌体内の物質醸造の異常によるものと考えられた。

しかしながら、第1表より明らかなどとく、KL-197-12B

第 2 表 振盪増殖速度

	5時間	7	9	11	13	16	17	19	21	23
No.133	0.01	0.03	0.09	0.23	0.35	0.64	0.70	0.77	0.80	0.82
KL-12B	0.00	0.00	0.00	0.05	0.06	0.21	0.27	0.41	0.58	0.68
K-7	0.01	0.07	0.20	0.39	0.52	0.78	0.79	0.83	0.89	0.90

表中、「KL-12B」はKL-197-12Bを表す(以下、同じ)。

\* KL-12BはK-7に比べると菌の生育量およびアルコール生成量に劣り、醸造適性を有するものではない。そこで、前記したごとく、K-7との戻し交配を行ったところグルタチオン漏出量を保持しつつKL-197-12Bに醸造適性が付与されたのである。

#### 参考例2

以下に示す手順により、該胞形成能欠損株KL-197-12Bを供与親、接合群K-7を反復親として戻し交配を繰り返した。

- 1) K-7から單相体株 (K-7-H-5、接合型♂およびK-7-H-6、接合型♀) を分離し、反復親とする。
- 2) KL-197-12B (接合型♀) とK-7-H-6とを交配して1代目雜種を得る。
- 3) 1代目雜種から單相体を分離し、その中から胞子形成能がなく、発酵能が良い株を選抜する。
- 4) 選抜株の接合型を決定する。
- 5) 選抜株とその接合型に適合するK-7單相体株との戻し交配を行って2代目雜種を得る。
- 6) 以下、同様にして戻し交配を繰り返す。

戻し交配の結果、胞子形成能が欠損し、かつ発酵能が付与された優良株を選抜し、サッカロマイセス・セレビシエNo.133 (以下、No.133という) を得た。

このNo.133株は、平成2年2月8日、受託者寺FERMI P-11269の下に工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した。

このNo.133株の菌特徴を以下に述べる。

No.133株の増殖速度

菌株No.133および母株をYPD液体培地 (バクトーイイストエキストラクト1%、バクトーベブトン2%、グルコース2%、以下同じ) 7mlに各々 $7 \times 10^8$ 個植菌し、25°Cで振盪培養および静置培養を行い、濁度計で培養液の濁度 (OD<sup>660</sup>) を経時的に測定することによって増殖速度を測定した。結果を第2表および第3表に示す。

表 3 酵母増殖速度

	3時間	9	11	16	19	21	27	30	32
No.133	0.00	0.04	0.08	0.19	0.37	0.39	0.54	0.59	0.60
KI-12B	0.00	0.00	0.00	0.13	0.22	0.36	0.38	0.40	0.43
K-7	0.00	0.10	0.16	0.43	0.52	0.55	0.60	0.64	0.68

第2表および第3表より、本発明の酵母菌株No.133は同競争の中間の増殖速度を有していることが判明した。アルコール生成に及ぼすグルコース濃度の影響  
No.133と両親株を2~25%のグルコースを含むYPD液体培地及び各々 $1 \times 10^9$ 個種菌し、25°Cで7日間酵母培養を行い、アルコール生成に及ぼすグルコース濃度の影響を調べた。生育は発生するのみガスの減少率により観察し、アルコール生成量は培養終了後の滤液を試料としてガスクロマトグラフィー法により測定した。

第 4 表

No.133

	1日	2	3	5	6	アルコール(%)
2%	0.024	0.049	0.073	0.100	0.113	1.17
5%	0.023	0.068	0.115	0.178	0.199	2.80
10%	0.033	0.094	0.178	0.230	0.340	5.21
20%	0.023	0.070	0.150	0.300	0.360	5.87

KI-197-12B

	1日	2	3	5	6	アルコール(%)
2%	0.020	0.047	0.072	0.101	0.116	1.33
5%	0.025	0.065	0.110	0.182	0.215	2.78
10%	0.025	0.068	0.122	0.223	0.274	4.28
20%	0.014	0.046	0.100	0.210	0.289	3.15

K-7

	1日	2	3	5	6	アルコール(%)
2%	0.025	0.053	0.076	0.103	0.119	1.11
5%	0.047	0.121	0.169	0.209	0.216	2.69
10%	0.039	0.100	0.172	0.230	0.334	5.61
20%	0.038	0.105	0.198	0.350	0.432	7.03

表中、各グルコース濃度におけるCO<sub>2</sub>ガス放出量(g)を記す。

第4表より、本発明酵母No.133は、生育能および発酵能に関しては、酸性用酵母(K-7)にほぼ近い性質を有することが判明した。

グルタチオンの産出能

次に、白米による醸造を行う前に、白糖を用いた醸化液において本発明酵母の性質を調べた。白糖培養液(第6表参照)中に、酵母菌体を同数種植し、15°Cで酵母培養を行い、発酵能および菌体内生理活性成分の1つとして、グルタチオンの漏出能について経時的に測定した。なお、白米培養液は、精米歩合75%の米を粉砕したものを、白糖培養液は精米歩合80%~75%の間に生じる壁を使用し、各々を汲水歩合250%において酵素剤(ブロテアーゼMアマノ、元野製薬(株)製)を用いて調製した。

第5表 アルコールの生成経過(%)

	2日	6	9	16	22
No.133	1.28	4.42	7.03 (0.23)	10.73 (0.40)	12.18 (1.93)
KI-12B	0.03	0.06	0.13 (0.37)	0.38 (0.60)	0.61 (1.22)
K-7	1.34	5.00	7.68 (0.16)	12.74 (0.18)	13.80 (0.63)

( )内はグルタチオン量(μg)

第6表 醸化液中の谷胱アミノ酸およびグルタチオン基質アミノ酸含量

	システィン	メチオニン	グルタミン酸	グリシン
白米醸化液	0.19	1.36	1.50	0.98
白糖醸化液	0	0.62	0.69	0.52

(汲水歩合250%、表中単位はμg)

白米醸化液中には、グルタチオン生成の基質となり得る含硫アミノ酸の含有量が少ないにもかかわらず、(第6表参照)、No.133はグルタチオンを漏出しており、そのグルタチオン漏出能は、競争である液胞形成能欠損酵母(KI-197-12B)に匹敵する能力を備えたものであった(第5表)。また、発酵能は、KI-197-12Bとは無なりもう1つの競争であるK-7と同程度の能力を有していた(第4表)。

さらに、原料中の基質アミノ酸含有量から推定すると、白米を原料として用いることにより、さらにグルタチオン濃度が上昇することも予想された。

以上の測定より、本発明の酵母は、酒類醸造の適性を持

ち、さうに酵母菌体内に生産、貯蔵されるグルタチオンを菌体外に漏出する新規な性質を有するものであることが確認された。従って、この酵母を酒類醸造に用いることにより、グルタチオン含有清酒が製造できると考えられた。

そこで、この新規な酵母を用いて小仕込試験を行うこととした。

#### 実施例2 小仕込試験

本実施例では、常法に従い、2段仕込みによる清酒製造を行った。仕込配合および発酵経過を第7表、第8表に示す。

第7表 仕込配合

原料	1日目	2日目	5日目(留)	合計
鶴米(g)	41.7	20.3	138.0	200
麹米(g)	—	20.3	138.0	158.3
酵母(g)	41.7	—	—	41.7
乳酸(g)	0.192	—	—	0.192
濾水(ml)	240	—	40	280
酵母(CO)	$4.8 \times 10^4$	—	—	—

(留)：留仕込み(以下、同じ)

第8表 仕込み結果

	CO <sub>2</sub> 発生量(g)	上槽日	アルコール(%)	グルタチオン(mM)	醪度(mM)	アミノ酸度(mM)
留日	前	11				
WJ33	28 51 58	20	17.2	16.14	2.20	3.01
KL-197-12B	17 23 42	22	11.0	3.66	2.80	2.86
K-7	45 63 73	18	19.6	1.35	2.97	1.15

半 留仕込みの日を1日目とする(以下、同じ)

第8表より、本発明酵母を用いると、従来から一般的に使用されている醸造用酵母(K-7)で仕込んだ酒よりもグルタチオンの含有量は10倍以上多くなることが分かる。また、グルタチオンの漏出量も自発酵化液で行ったときよりも多いものであった(第5表参照)。一方、液胞形成能欠陥株の親株であるKL-197-12Bは、生育および完熟能力が悪く、十分量のグルタチオンの漏出およびアルコールの生成が認められなかった。

さらに、上槽後のきき酒により、本発明酵母(WJ33)により製造した酒は、従来の醸造用酵母(K-7)により醸造した酒の酒質と比べても劣ることはなく、かつ、自己消化臭などの異臭、異味は全く感じられないことが判明した。

以上、本発明の酵母を用いることにより、グルタチオンを従来酒よりも高濃度に含有した酒類を製造できること

が分かる。

そこで、以下の実施例においてスケールアップして製造を試みた。

#### 実施例3 二段仕込

本実施例では、通常の条件に従い、鶴米400gの2段仕込を行った。仕込配合および仕込結果を第9表および第10表に示す。

第9表 仕込配合

原料	1日目	2日目	5日目(留)	合計
鶴米(g)	83.4	40.6	276.0	400
麹米(g)	—	40.6	276.0	316.6
酵母(g)	83.4	—	—	83.4
乳酸(g)	0.384	—	—	0.384
濾水(ml)	480	—	80	560
酵母(CO)	$9.6 \times 10^4$	—	—	—

第10表 仕込み結果

	CO <sub>2</sub> 発生量(g)	上槽日	アルコール(%)	グルタチオン(mM)	醪度(mM)	アミノ酸度(mM)
留日	前	12				
WJ33	15 99 100	17	15.8	20.88	3.12	3.40
K-7	20 116 123	17	19.6	2.78	2.60	1.86

鶴米400gの二段仕込においても、鶴米200g(第8表)と同様に本発明の酵母(WJ33)で仕込んだ酒は、順調な発酵経過を示しアルコール生成量も充分であった。グルタチオン漏出量においても、本発明酵母は従来の醸造用酵母(K-7)で仕込んだ酒よりもグルタチオンを多く含有したものであり、かつとき酒における品質面の鑑定でも自己消化臭などの異臭、異味は感じられなかった。

このように、二段仕込において、本発明の酵母を用いた場合には所定の酒類が得られた。

#### 実施例4 三段仕込

本実施例では、通常の清酒の仕込みに用いられる三段仕込を行った。

第11表 仕込配合

原料	水麹	添付	仲仕込	留仕込	合計
鶴米(g)	10.0	30.0	60.0	160.0	200.0
麹米(g)	—	30.0	48.0	82.0	160.0
酵母(g)	10.0	—	12.0	18.0	40.0
乳酸(g)	0.192	—	—	—	0.192
濾水(ml)	80.0	—	74.0	146.0	200.0
酵母(CO)	$1.2 \times 10^4$	—	—	—	—

11  
第12表 仕込み結果

	CO <sub>2</sub> 量(g)	上槽 日	上槽 日	アル コール (%)	グル タチ オニ (%)	酸 度 (ml)	アミ ノ酸 度 (ml)
Nu133	21 50 55	20	15.3	15.08	2.80	2.80	
K-7	37 61 63	13	17.3	1.64	3.16	1.15	

本発明の酵母を用いて3段仕込を行った結果、2段仕込における結果と同様に(第8表、第10表参照)、K-7よりもグルタチオンが多く含まれた酒を製造することができた。また、さき酒の結果においても同様に、従来の酸対応酵母(K-7)により製造した酒と比べ劣ることはなく、かつ、自己消化臭などの異臭、異味は全く認められなかった。

このように、通常の清酒の仕込み配合による酸対応においても本発明の酵母を用いると所望のグルタチオン含有清酒が得られることが判明した。

#### 実施例5 酵経過および生理性成分

本実施例では、本発明の酵母の粉末400gの2段仕込を行い、酵経過ならびにグルタチオン以外の生理性成分の合算量についても記載する。

第13表 Nu133酵経過

上槽 日	グルタ チオン (%)	アルコ ール (%)	CO <sub>2</sub> 量 (g)	紫外外部吸収		アミ ノ酸 度 (ml)
				OD <sup>420</sup>	OD <sup>360</sup>	
1	6.88	7.68	3.10	0.439	0.442	0.60
4	2.30	8.28	6.56	0.348	0.366	0.50
7	3.84	13.81	9.03	0.268	0.285	0.95
3	3.54	14.40	10.15	0.514	0.516	0.70
9	3.18	15.02	10.70	0.540	0.540	0.90
11	4.83	16.04	11.50	0.627	0.594	0.91
12	8.51	16.47	11.66	0.712	0.806	1.20
13	13.64	17.17	11.68	0.738	0.657	1.20
14	15.86	17.00	12.36	0.871	0.742	1.52
15	18.19	17.19	12.29	0.860	0.717	1.39
16	18.55	16.75	14.28	1.012	0.840	1.68
18	20.72	17.09	14.25	0.981	0.783	1.70

第14表 K-7酵経過

上槽 日	グルタ チオン (%)	アルコ ール (%)	CO <sub>2</sub> 量 (g)	紫外外部吸収		アミ ノ酸 度 (ml)
				OD <sup>420</sup>	OD <sup>360</sup>	
1	0.77	8.23	3.32	0.367	0.288	0.45
4	1.99	10.98	6.81	0.344	0.371	0.25
7	1.75	14.69	9.88	0.277	0.302	0.45
8	1.38	16.35	10.35	0.488	0.521	0.45
9	1.07	15.87	11.59	0.589	0.554	0.70

上槽 日	グルタ チオン (%)	アルコ ール (%)	CO <sub>2</sub> 量 (g)	紫外外部吸収		アミ ノ酸 度 (ml)
				OD <sup>420</sup>	OD <sup>360</sup>	
11	1.26	17.16	11.95	0.642	0.656	0.80
12	1.22	17.42	12.00	0.649	0.657	0.78
13	1.59	18.14	12.88	0.883	0.875	0.50
14	1.83	18.41	13.75	0.892	0.878	0.75
15	1.83	18.98	15.19	0.923	0.898	0.60
16	2.04	19.11	14.26	0.857	0.799	1.80
18	3.26	18.97	16.63	1.007	0.916	1.00

本発明酵母による仕込の結果、酵の発酵に腐敗でありアルコールの生成とともに酸中和活性陣に酒中にグルタチオンを漏出していることが認められた(第13表)。一方、従来の酵母(K-7)ではグルタチオンの酒中の漏出は極めて少ないものである(第14表)。

今回、本発明により製造される酒は、従来の酒に比べ酒中に他の生理活性成分を多く含むことが判明したが、これを以下の測定結果により示す。

まず、酵発酵中の紫外外部吸収値(OD<sup>420</sup>、OD<sup>360</sup>)および核酸の純度(OD<sup>420</sup>/OD<sup>360</sup>)を示す。

第15表 紫外部吸収の推進

	Nu133		K-7			
	OD <sup>420</sup>	OD <sup>360</sup>	比	OD <sup>420</sup>	OD <sup>360</sup>	比
1日	0.439	0.442	0.983	0.387	0.388	0.977
4	0.348	0.366	0.951	0.344	0.371	0.927
7	0.268	0.265	0.993	0.277	0.302	0.917
8	0.514	0.516	0.986	0.488	0.521	0.937
9	0.540	0.540	1.000	0.539	0.554	0.972
11	0.627	0.584	1.056	0.642	0.650	0.988
12	0.712	0.600	1.187	0.649	0.657	0.988
13	0.738	0.557	1.323	0.833	0.875	0.952
14	0.871	0.742	1.174	0.892	0.876	1.018
15	0.360	0.717	0.999	0.923	0.898	1.033
16	1.012	0.840	1.205	0.857	0.799	1.073
18	0.961	0.783	1.253	1.007	0.916	1.099

表中、「比」とあるのはOD<sup>420</sup>/OD<sup>360</sup>値を示す。

46 本発明の酵母に仕込において、酵中の核酸の吸収を示すOD<sup>420</sup>の値、および核酸の純度を示すOD<sup>420</sup>/OD<sup>360</sup>の値の増加が認められた(第15表)。これら核酸の増加の原因は、酵母の自己消化か菌体の破壊によるものと考えられる。しかしながら、酵母の自己消化は通常伴う異臭が全く認められたなかったことから、漏出は自己消化によるものではなく菌体の破壊によると考えられる。

従って、本発明の酵母においては、参考例1に記載した酵母菌体内の物質輸送の異常により起こる菌体内成分の菌体外漏出と、さらに、本実施例の第1段より考えられる感の変化と共に生じる酵母菌体外の浸透圧変化による

13  
菌自体の破壊の両方によって、酵母菌体内の有用生理活性成分の漏出が行われていると判断される。

その他の生理活性成分の例として、以下にアミノ酸、ビタミンについて測定した結果を示す。

1) アミノ酸

測定方法：二段仕込みにおける醪日数18日目の過濾を日立アミノ酸アナライザーを用いて分析した。

第16表 アミノ酸組成

	M133 2段仕込	K-7 2段仕込
アスパラギン酸	7.73 (2.8)	1.14 (0.9)
スレオニン	16.58 (5.5)	9.39 (7.8)
セリン	9.80 (3.3)	2.68 (2.2)
グルタミン酸	35.38 (11.7)	11.19 (9.1)
グリシン	18.05 (6.0)	5.94 (4.8)
アラニン	30.92 (10.3)	9.16 (7.4)
シスチン	3.34 (1.1)	1.12 (0.9)
バリン	17.22 (5.7)	4.30 (3.5)
メチオニン	1.30 (0.4)	0.64 (0.5)
イソロイシン	7.92 (2.6)	1.99 (1.6)
ロイシン	20.88 (6.9)	8.48 (6.9)
チロシン	14.65 (4.9)	4.82 (4.0)
フェニルアラニン	16.48 (5.5)	6.86 (5.6)
アーバル	3.42 (1.1)	0.20 (0.2)
オルニチン	4.88 (1.6)	2.54 (2.1)
リジン	14.29 (4.7)	6.37 (5.2)
エタノールアミン	5.96 (2.3)	5.16 (4.2)
ヒスチジン	5.76 (1.9)	3.02 (2.4)
トリプトファン	1.37 (0.5)	0.00 (0.0)
アルギニン	52.40 (17.4)	23.82 (19.3)
プロリン	12.16 (4.0)	13.63 (11.0)
アンモニア	0.00 (0.0)	0.95 (0.8)
合計	301.49(100%)	123.41(100%)

表中の単位：mg/100ml、( )：%表示

アーバル：アーバルアミノ酸

第16表に示すとく、本発明の酒には、従来の酒に比べて約3倍のアミノ酸が含有される。また、各アミノ酸の含有比も従来のものとはほとんど差ではなくバランスがとれたものである。

2) ビタミン

測定方法：2段仕込における上槽酒中のチアミンを、チオ

フロントページの続き

(72)発明者 仲田 畏敬

兵庫県川西市水明台2丁目1番7号

\*クローム法により測定した。

第17表 チアミン測定

	M133	K-7
チアミン	12	2

表中の単位はmg/ml

第17表に示すとく、本発明の製法による酒はK-7酒に比べてチアミンの含有量が多い。このチアミンは、本発酵菌体内のみで生成、貯蔵され、菌体外には漏出されないものであるから、本発明の酵母はこのような生理活性成分まで漏出する優れた漏出能を有することが確認される。

発明の効果

本発明により、通常の酒類醸造に用いられる酵母に匹敵する発酵能を有し、グルタチオンその他の生理活性成分の漏出量が多い酵母が提供される。また、この酵母を用いることにより、通常の清酒の仕込配合、および従来の製法では製造することができなかった、菌体内で生成、

20 防腐される種々の生理活性成分を多く含み、かつ、品質にも優れた酒類を製造する方法が提供される。

39

(72)発明者 浜地 正昭

兵庫県神戸市北区筑紫ヶ丘4丁目3番5号

(72)免明者 本島 雄光  
兵庫県宝塚市光が丘1丁目2番36号

(72)免明者 布川 弥太郎  
兵庫県芦屋市平岡町2番25号

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

**BLACK BORDERS**

**IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

**FADED TEXT OR DRAWING**

**BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

**SKEWED/SLANTED IMAGES**

**COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

**GRAY SCALE DOCUMENTS**

**LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

**REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

**OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**